

郝婧玮,张 蕾,秦金玲,等. 川牛膝多糖联合维生素 C 体外抑制 HepG-2 肿瘤细胞活性的作用[J]. 江苏农业科学,2020,48(11):192-196.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.11.038

川牛膝多糖联合维生素 C 体外抑制 HepG-2 肿瘤细胞活性的作用

郝婧玮,张 蕾,秦金玲,梅念念,黄 静

(牡丹江师范学院生命科学与技术学院,黑龙江牡丹江 157011)

摘要:为了解川牛膝多糖联合维生素 C 抑制肿瘤细胞活性作用,采用超声波提取法从川牛膝根中提取川牛膝多糖(RCP),经 Sevage 法除去蛋白,并采用 30% 双氧水脱色、浓缩、冻干,得到川牛膝粉针剂,通过苯酚硫酸法制作葡萄糖标准曲线,进而测得多糖含量。体外联合维生素 C 作用于肝癌 HepG-2 细胞,采用噻唑蓝(MTT)法研究对 HepG-2 细胞的抑制作用。结果表明,川牛膝多糖与维生素 C 均可抑制肝癌 HepG-2 细胞的增殖,当多糖质量浓度为 5、50、100、200 mg/mL 时,对肝癌 HepG-2 的抑制率分别为 19.7%、62.1%、59.1%、65.1%。当维生素 C 的浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4 mmol/L 时,对肝癌 HepG-2 的抑制率为 10%、11%、12%、54%。研究结果提示两者对肿瘤的抑制均呈剂量依赖性,当两者联合用药时,两者呈协同增效抗肿瘤作用,随着两者浓度的增加抑制率逐渐增强,对 HepG-2 细胞的最大抑制率可达 84.2%。

关键词:川牛膝多糖;维生素 C;肝癌;HepG-2 细胞

中图分类号: R735.7;R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)11-0192-04

牛膝为苋科多年生草本植物,主要分为怀牛膝(*Achyranthes bidentata*)和川牛膝(*Cyathula capitata*)2 种。《中华人民共和国药典(2015 年版)》上记载,牛膝有补肝肾、强筋骨、逐瘀通经、引血下行之功效^[1]。川牛膝主产于四川省、贵州省、云南省、福建等地,具有活血、利尿、降血糖、保肝、增强机体免疫力等功效。近年来,对川牛膝的抗肿瘤研究较多,其多糖成分^[3] CoPS1、CoPS2、CoPS3 被认为是其主要活性成分并具有抗肿瘤作用^[4]。陈红等人观察了川牛膝多糖对小鼠肉瘤、小鼠肝癌的抑制作用及对环磷酰胺(Cy)所致正常及荷瘤小鼠外周白细胞减少的影响^[5],表明川牛膝多糖对小鼠肝癌(S180)的抑制率为 21.99%~42.21%;对环磷酰胺(Cy)所致正常或荷瘤小鼠外周血白细胞减少有极显著的回升作用,说明川牛膝多糖不仅有抗肿瘤作用,还能减轻 Cy 所致外周白细胞减少。宋军等对川牛膝多糖对小鼠肝癌细胞 H22 抑制作用研究表明,Cy 对

肝癌细胞 H22(腹水型)有强烈的抑制作用^[6]。川牛膝多糖对小鼠肝癌细胞 H22(腹水型)有一定的抑制作用,其抑瘤作用及机理有待进一步研究。

作为生物体内普遍存在的一类生物大分子,来源于中药的多糖^[7-9]已超过 200 种,诸多研究表明多糖具有促进机体免疫力、抗菌、抗病毒、抗寄生虫、抗肿瘤、抗辐射、抗衰老、抗炎、降血脂等生物活性,目前在临床上已用于治疗肝炎、艾滋病、癌症和许多其他疾病^[10-15]。有研究发现,维生素 C 不仅可以保护细胞,还可以抑制和杀伤肿瘤细胞,维生素 C 有抗胃癌、宫颈癌^[16-17]作用。本研究以川牛膝根中提取的川牛膝多糖(RCP),在体外联合维生素 C 作用于肝癌 HepG-2 细胞,研究对 HepG-2 细胞的抑制作用,旨在探讨川牛膝多糖抗肿瘤作用机制,为抗肿瘤药物机制的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 细胞株与试剂 细胞株,人肝癌 HepG-2,由哈尔滨工业大学传代保种。川牛膝,产地为四川。维生素 C,天津市永大化学试剂有限公司;胎牛血清,赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司;PBS 冲液,瑞楚生物;胰蛋白酶-EDTA 溶液,源叶

收稿日期:2019-05-17

基金项目:黑龙江省教育厅项目(编号:1353MSYQN009);黑龙江省牡丹江市科学技术计划(编号:Z2018s074);黑龙江省大学生创新创业训练计划(编号:201810233031)。

作者简介:郝婧玮(1985—),女,辽宁宽甸人,硕士,讲师,主要从事肿瘤药理学研究。Tel:(0453)6511042;E-mail:swxhjw@126.com。

生物;DMSO,岳阳湘茂医药化工有限公司;DMEM 培养基,美国 Gibco 公司。

1.1.2 主要仪器 超声波清洗机(SB-5200DT),购于宁波新芝生物科技有限公司;冷冻干燥机(FD-1),购于北京博医康技术公司;旋片真空泵(2XZ-2),浙江黄岩求精真空泵厂制造;电热恒温水浴锅(HWS28),购于上海一恒科技有限公司;超级恒温水浴(HH-601),购于江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司;手提式压力蒸汽灭菌器(XFS-280),购于浙江新丰医疗器械有限公司;电热鼓风干燥箱(DHG-9055A),购于上海一恒科学技术有限公司;循环水真空泵(SHZ-D3),购于巩义市予华仪器有限责任公司;生物安全柜(BHC-1300IIA2),购于蓟州净化;超低温冰箱(U410-86),购于 Peppercom 公司;紫外分光光度计(722N),购于北京普析通用仪器有限公司;电子天平(BSA224S-CW),购于赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;Synergy HTX(SILFTA),购于美国伯腾仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 牛膝多糖粗提取物的提取 称取川牛膝粉末 500 g,按料液比 1 g:13 mL 加入蒸馏水浸泡 1.5 h,60 ℃ 超声提取 2 h,过滤、弃滤渣,合并提取液。90 ℃ 浓缩,待浓缩液呈黏稠状,冷却,按照浓缩液与乙醇比 1:9 的体积比加入无水乙醇,搅拌均匀,静置过夜。弃上清、取沉淀、洗涤,即为川牛膝多糖粗提取物。将多糖粗提取物加适量蒸馏水使其溶解,得多糖粗提取液。

1.2.2 牛膝多糖粗提取物的精制与冻干 按 5:1 (多糖粗提取液:30% 过氧化氢)体积比加 30% 过氧化氢脱色素,温度控制在 50 ℃,脱色 2~4 h,期间用氨水调 pH 值保持在 8.0 左右。重复处理 5 次后,溶液由橙黄变为近透明状,视为脱色完成。按 Sevage 试剂与多糖粗提取液以 1:3 的体积比于分液漏斗中萃取 3 次,分离上层多糖提取物。将处理后的多糖置于 50 ℃ 恒温水浴锅中水浴、浓缩,将浓缩液倒在若干培养皿中,使溶液铺满皿底薄薄一层,放在 -80 ℃ 冰箱中预冻 24 h,取出放置冷冻干燥机中 -200 ℃,8 h 冻干,密封冷藏,备用。

1.2.3 苯酚硫酸法制定葡萄糖标准曲线 称取 0.1 g 葡萄糖,倍比稀释得 100 μg/mL 的葡萄糖溶液。称取 5 g 苯酚,置 100 mL 容量瓶中定容,制得 5% 苯酚溶液,避光保存。分别取 9 支 25 mL 干燥的

具塞比色管,编号依次为 0~8 号,0 号作空白组校正,1~8 号分别加入 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mL 葡萄糖溶液,再加蒸馏水补至 2 mL,后加入 0.8 mL 5% 苯酚试液、5 mL 98% 浓硫酸,充分振荡,蒸馏水补至 9 mL。100 ℃ 沸水浴 15 min,冷却,490 nm 处测吸光度。

1.2.4 标准曲线精密度测定 称取 0.1 g 葡萄糖,定容至 50 mL,制成 2 mg/mL 葡萄糖样液,精确吸取 250 μL 样液于 50 mL 容量瓶中,加水定容至刻度,得 10 μg/mL 的葡萄糖供试液。取 5 支具塞试管,编号依次为 0~4 号,0 号为空白组,1~4 号为试验组,每组分别吸取 1 mL 葡萄糖供试液,按照标准曲线法测得每组葡萄糖的吸光度,求 RSD 值。

1.2.5 川牛膝冻干粉多糖百分含量测定 称取川牛膝多糖冻干粉 0.1 g,配制成 0.06 mg/mL 川牛膝多糖供试液。按照标准曲线法测量川牛膝多糖在 490 nm 处的吸光度,带入标准曲线方程得到川牛膝多糖相当于葡萄糖的浓度,根据公式(1)得出川牛膝多糖的百分含量:

$$A = \frac{C \times D}{m} \times 10^3 \times 100\% \quad (1)$$

式中:A 为川牛膝多糖的百分含量,%;C 为川牛膝多糖相对于葡萄糖的浓度(μg/mL);D 为稀释倍数;m 为称取干燥恒质量的川牛膝冻干粉的质量(mg)。

1.2.6 细胞的复苏与传代 取出冻存细胞,融化,采用 DMEM 洗去冻存液。转移至含有 0.5 mL 10% 胎牛血清、3.5 mL DMEM 的培养皿中,放入 CO₂ 恒温培养箱,24 h 后观察细胞生长状况并更换培养液。当细胞铺满皿底时,开始传代。弃去细胞培养皿中的培养液,加适量胰酶,37 ℃ 消化 1 min,加适量血清,终止胰酶消化反应。离心、弃上清,加 2 mL DMEM 吹打均匀。各吸取 1 mL 细胞液分别置于含 0.5 mL 胎牛血清和 3.5 mL DMEM 的培养皿中,轻轻振荡,混匀,于倒置显微镜观察。放入 CO₂ 恒温培养箱中,24 h 后观察细胞生长状况。

1.2.7 不同浓度牛膝多糖作用于 HepG-2 肿瘤细胞 取对数期细胞悬液,置 96 孔板中,每孔 80 μL,于 CO₂ 恒温培养箱中孵育,过夜,使细胞铺满孔底。分别取 0.025、0.250、0.500、1.000 g 川牛膝多糖,溶于 1 mL DMEM 中配制成 0.025、0.250、0.500、1.000 g/mL 的多糖培养液,每个质量浓度梯度设 2 个复孔,以不加多糖的细胞作空白对照。在每孔中加入 20 μL 不同质量浓度梯度的多糖培养液,孵育

24 h,倒置显微镜观察。每孔加入 20 μL MTT,注意遮光,放培养箱培养 4 h,终止培养,弃去多糖培养液。每孔加 100 μL 二甲基亚砜,振摇 10 min,用酶标仪在 490 nm 下测量吸光度。

1.2.8 不同浓度维生素 C 作用于 HepG-2 肿瘤细胞 分别取 0.02、0.04、0.05、0.07 g 维生素 C 溶于 1 mL 培养基中,配制成 0.1、0.2、0.3、0.4 mmol/L 的维生素 C 液,每个浓度梯度设 2 个复孔,以不加药孔作为空白孔。其他步骤同“1.2.7”节。

1.2.9 不同质量浓度川牛膝多糖联合不同浓度维生素 C 作用于 HepG-2 肿瘤细胞 将维生素 C (0.1、0.2、0.3、0.4 mmol/L) 和多糖(0.025、0.250、0.500、1.00 g/mL) 按不同浓度或质量浓度梯度从小到大联合用药,每组设 2 个复孔。以细胞原液作空白孔,其他步骤同“1.2.7”节。

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线与川牛膝多糖含量的测定

葡萄糖在吸收光 490 nm 所得的曲线回归方程为 $y = 0.009x + 0.1256$, $r^2 = 0.9322$ 。葡萄糖质量浓度在 20 ~ 90 $\mu\text{g/mL}$ 与吸光度呈良好的线性关系。精密度 $RSD = 2.6\% < 5\%$,说明试验精密度良好。计算得川牛膝的百分含量为 64.8%,其中 $C = 38.93 \mu\text{g/mL}$, $D = 1666.7$, $m = 100 \text{ mg}$ 。

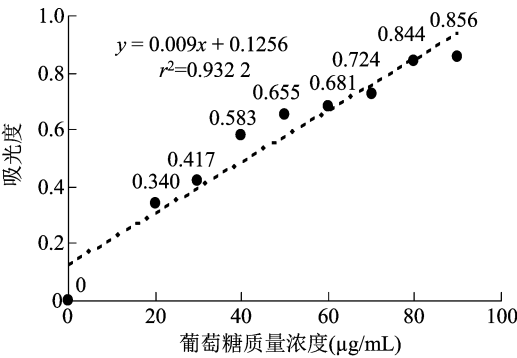


图1 葡萄糖标准曲线

由表 1 可知,将 0.06 mg/mL 川牛膝多糖供试液设 2 平行对照组于 490 nm 处,测得吸光度值,代入葡萄糖标准曲线得到川牛膝多糖相对于葡萄糖的含量为 64.8%。试验采用的是超声波辅助提取法,收率高于浸渍法。

表 1 0.06 mg/mL 川牛膝多糖吸光度

组别	吸光度
1	0.511
2	0.447
3	0.470

2.2 川牛膝多糖对 HepG-2 肿瘤细胞活性的抑制

由图 2 可知,川牛膝多糖(RCP)体外有很好的抗肿瘤活性,在川牛膝多糖(RCP)体外作用于 HepG-2 细胞 24 h 内,抗肿瘤效果呈剂量依赖性,随着剂量增高抑制率也随之增高。川牛膝多糖(RCP)质量浓度这 50 mg/mL 时,抑制率达到 62.1%,随后再增加川牛膝多糖(RCP)的质量浓度,抑制率增加幅度变小。当多糖质量浓度为 100 mg/mL 时,抑制率为 59.1%,接近 50%,可将 100 mg/mL 川牛膝多糖作为细胞的半数抑制浓度(IC_{50})。川牛膝多糖质量浓度为 200 mg/mL 时,抑制率达到 65.1%,为最大抑制率。

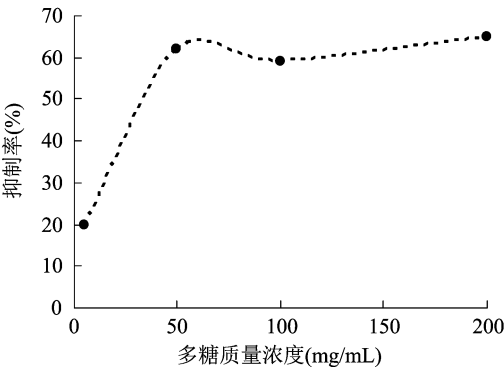


图2 川牛膝多糖(RCP)对 HepG-2 细胞增殖的影响

2.3 维生素 C 对 HepG-2 肿瘤细胞活性的抑制

维生素 C 体外也有抗肿瘤活性,24 h 内,随着维生素 C 浓度的增高,抑制率也呈上升趋势,抗肿瘤活性呈剂量依赖性。维生素 C 浓度为 0.4 mmol/L 时,抑制率为 54%(图 3),接近 50%,可将 0.4 mmol/L 维生素 C 看作半数抑制浓度(IC_{50})。

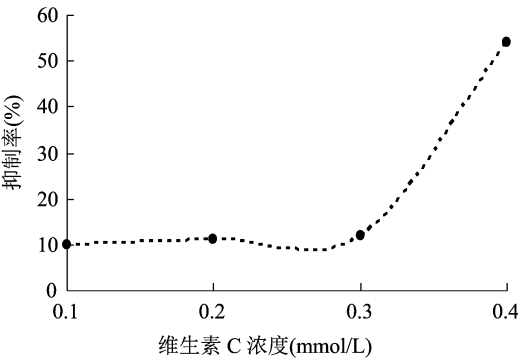


图3 维生素 C 对 HepG-2 细胞增殖的影响

2.4 川牛膝多糖联合维生素 C 对 HepG-2 肿瘤细胞活性的抑制

由图 4 可知,不同质量浓度或浓度组合的川牛

膝多糖(5、50、100、200 mg/mL)与维生素 C(0.1、0.2、0.3、0.4 mmol/L)联合作用于 HepG-2 细胞 24 h,MTT 法检测并计算出对细胞的抑制率,结果呈现剂量依赖性,当川牛膝多糖浓度固定时,随着维生素 C 浓度的上升,抑制率逐渐升高。200 mg/mL 的川牛膝多糖与维生素 C 的联合抗肿瘤活性是所有组合中的最佳组合。当维生素 C 浓度为 0.4 mmol/L,多糖质量浓度为 200 mg/mL,抑制率达到最大值 84.2%。0.2 mmol/L 维生素 C 与不同质量浓度多糖联合对细胞的抑制率均很接近。

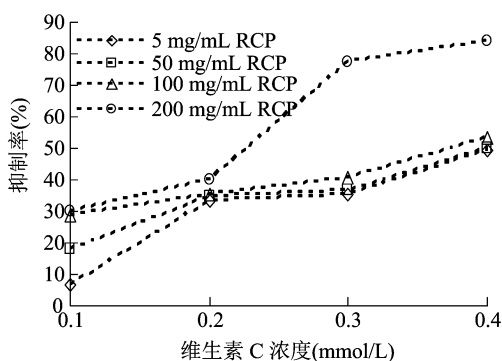


图4 川牛膝多糖(RCP)联合维生素 C 对 HepG-2 细胞增殖的影响

3 讨论

3.1 苯酚硫酸法测定条件因子选择

苯酚硫酸法测多糖含量的原理为多糖在硫酸作用下水解成单糖,再与苯酚结合在吸收光为 490 nm 处的最大吸收值。由于不同多糖的组成不同,苯酚硫酸法采用的苯酚用量、浓硫酸用量也不尽相同。通过对川牛膝多糖苯酚硫酸法测定条件因子水平研究,本研究选择为 5% 苯酚 0.8 mL、98% 浓硫酸 5 mL。

3.2 多糖冻干喷瓶现象

在做多糖冻干粉时,出现喷瓶现象,可能是由于多糖的预冻不完全,冷冻干燥机升温过快导致试品部分液化,易在真空减压条件下出现喷瓶现象。也可能由于多糖浓缩液中有有机试剂残留过多,导致喷瓶。处理的方法为增加多糖预冻时间,控制冷冻干燥机升温速度,提高多糖浓缩温度,减少浓缩液体积,必要时进行旋蒸去除多糖中残留的有机试剂。

3.3 多糖及维生素 C 体外抑制 HepG-2 肿瘤细胞活性

肝癌是严重危害人类健康的病症之一,死亡率极高,目前化学药物在市场上占据主导地位。但是

化学药物对人体危害极大,耐药性产生概率极高,且单一用药难以控制病情发展^[18-20]。研究天然活性成分的抗肿瘤作用是科学领域的一个热门话题。试验根据 MTT 法测得川牛膝多糖、维生素 C 单独作用及两者不同浓度联合的体外抗肿瘤活性,证明了川牛膝体外的抗肿瘤活性。早有研究表明维生素 C 有助于预防胃癌、宫颈癌,对肝癌的研究鲜有研究。本试验证明维生素 C 在体外对 Hep-2 肝癌细胞的抗肿瘤活性,维生素 C 抗肿瘤活性比较低,可能与配制浓度太小有关,也可能是因为配制维生素 C 溶液时,未及时采取遮光措施导致维生素 C 分解,药效减弱。两者联用时,总体效果比单独抗肿瘤活性高,说明两者体外抗肿瘤具有协同作用。可能是由于维生素 C 影响 Hep-2 肝癌细胞 HIF 的表达和川牛膝多糖的抗肿瘤作用共同诱导细胞发生凋亡。

4 结论

研究发现,川牛膝多糖、维生素 C、川牛膝多糖联合维生素 C 均能抑制肝癌 HepG-2 细胞增殖活性,联合用药抑制率比两者单用要大。药物作用细胞的 24 h 内,当多糖质量浓度为 5、50、100、200 mg/mL 时,对细胞的抑制率分别为 19.7%、62.1%、59.1%、65.1%。当维生素 C 的浓度为 0.1、0.2、0.3、0.4 mmol/L 时,对肝癌 HepG-2 细胞的抑制率为 10%、11%、12%、54%,说明两者对肿瘤的抑制均呈剂量依赖性,且川牛膝多糖在低质量浓度时抗肿瘤活性就较大。维生素 C 在低浓度时抗肿瘤活性小,高浓度时明显增加。两者联合用药对肝癌 HepG-2 的抑制率最高可达 84.2%。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 韩大鹏,石关桐. 蒟道人《仙授理伤续断秘方》浅析[J]. 上海中医药杂志,2007,41(2):55-56.
- [3] Zhou R, Bo - Gang L I, Zhang G L. Glycosides from roots of cyathula officinalis kuan[J]. 2005,47(3):368-374.
- [4] 丁杰龙. 川牛膝多糖的抗肿瘤作用初探[J]. 中国民族民间医药,2009,18(13):46-47,115.
- [5] 陈红,刘友平. 川牛膝多糖抗肿瘤作用初探[J]. 成都中医药大学学报,2001,24(1):49-50.
- [6] 宋军,杨金蓉,李祖伦,等. 川牛膝多糖对小鼠肝癌细胞 H₂₂抑制作用研究[J]. 中药药理与临床,2001(3):19.
- [7] 吕晓英,马东瑞,李由,等. 红毛五加多糖对体外人胃癌细胞基因及细胞因子表达的影响[J]. 实用肿瘤杂志,2001(1):45-46.

贾文婷, 杨 慧, 吴洪斌, 等. 红枣变温压差膨化产品品质评价体系的研究[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(11): 196–201.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.11.039

红枣变温压差膨化产品品质评价体系的研究

贾文婷, 杨 慧, 吴洪斌, 金新文

(新疆农垦科学院农产品加工研究所/新疆农垦科学院农产品加工重点实验室, 新疆石河子 832000)

摘要:以新疆地区 5 个品种的红枣为原料, 采用变温压差膨化干燥工艺加工红枣脆片, 利用主成分分析法及层次分析法对红枣脆片品质评价指标进行数据分析, 建立包含基础数据库、指标测定方法、综合评价方法等在内的红枣脆片品质评价体系, 旨在为红枣脆片的品质评价及原料品种的加工适宜性研究提供理论依据和指导。

关键词:红枣脆片; 变温压差膨化干燥; 品质评价

中图分类号: TS255.42 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)11-0196-06

红枣是新疆地区非常具有优势特色的林果产品, 因其口感好、营养丰富而深受喜爱。随着种植技术的快速发展, 新疆南疆地区红枣产量逐年提高。目前红枣主要以初加工干燥为主, 由于市场供大于求, 干枣大量囤积, 因此开发新的枣产品成为迫切需求。近年来, 枣片、枣粉、脆枣等产品纷纷上市, 其中脆枣和枣片多以油炸方式制成, 虽然口感酥脆, 但含油量大, 对身体健康有不利的影响, 因此, 研究营养价值高且口味俱佳的半干枣干制方法

非常必要。变温压差膨化干燥技术是近几年刚兴起的一种新型、环保、节能, 专门用于生产非油炸果蔬脆片的膨化干燥技术, 变温压差膨化干燥设备生产的果蔬脆片是继油炸果蔬脆片、真空低温油炸果蔬脆片之后的第 3 代产品, 具有味道鲜美、口感酥脆、营养丰富、易于贮存、携带方便等特点^[1]。目前生产的变温压差膨化产品缺乏品质评价标准, 产品品质参差不齐, 为了科学地建立红枣变温压差膨化脆片品质评价体系, 并合理筛选红枣脆片的品质评价指标^[2]。根据目前国内外研究者的研究基础, 影响红枣脆片的品质指标主要有以下几个方面: 红枣的品种以及红枣脆片产品的感官、理化、营养、加工等品质等^[3]。其中, 感官品质的主要评价指标包括产品的色泽、膨化度、酥脆度等; 理化与营养品质的主要评价指标为产品的甜度、含水率、维生素 C 含量、蛋白质含

收稿日期: 2019-07-05

基金项目: 新疆生产建设兵团科技支疆项目(编号: 2013AB020)。

作者简介: 贾文婷(1987—), 女, 河北鹿泉人, 硕士, 助理研究员, 主要从事果蔬加工研究。E-mail: 4947637@qq.com。

通信作者: 金新文, 博士, 副研究员, 主要从事果蔬加工研究。E-mail: @qq.com。

[8] 邹 翔, 孙 宇, 王宏亮. 芦荟多糖对荷瘤小鼠肿瘤细胞膜功能的影响[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2005, 21(1): 11–13, 5.

[9] 季宇彬, 高世勇, 张秀娟. 羊栖菜多糖诱导肿瘤细胞凋亡的研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(3): 245–247.

[10] 陶 喆, 程建明. 中药多糖抗肿瘤机制探讨[J]. 江苏中医药, 2003, 24(6): 47–49.

[11] 郑 敏. 中药多糖抗肿瘤的药理学研究进展[J]. 国外医学(中医中药分册), 2000, 22(5): 259–263.

[12] 郑应馨, 徐恒卫. 具有抗肿瘤活性的多糖及其作用机理研究概况[J]. 中国药师, 2003(6): 368–369, 372.

[13] 黄 芳, 蒙义文. 活性多糖的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 1999(5): 90–98.

[14] 张忠玲, 朱 波, 张 翠, 等. 海胆肠多糖致 Bel7402 人肝癌细胞凋亡的扫描电镜观察[J]. 电子显微学报, 2003, 22(6): 467.

[15] Wang B J, Won S J, Yu Z R, et al. Free radical scavenging and apoptotic effects of cordyceps sinensis fractionated by supercritical

carbon dioxide[J]. Food and Chemical Toxicology, 2005, 43(4): 543–552.

[16] 王新保, 秦 双, 张迎黎. 维生素 C 对体外胃癌细胞的影响[J]. 新乡医学院学报, 1998, 15(4): 33–35.

[17] 李 能, 周 波, 陈忠东. 维生素 C 对 Hela 细胞系增殖及细胞周期的影响[J]. 南华大学学报(医学版), 2004, 32(2): 161–163.

[18] Germano S, O'Driscoll L. Breast cancer: understanding sensitivity and resistance to chemotherapy and targeted therapies to aid in personalised medicine[J]. Current Cancer Drug Targets, 2009, 9(3): 398–418.

[19] Zhao Q Z, Dou K F. Methylation of ras association domain family protein 1, isoform a correlated with proliferation and drug resistance in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721[J]. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2007, 22(5): 683–689.

[20] Porta L, Caterina. Mechanism of drug sensitivity and resistance in melanoma[J]. Current Cancer Drug Targets, 2009, 9(3): 391–397.